

Diagnóstico

MICROBIOLOGÍA

Comparación de cinco protocolos de extracción de ADN a partir de tejido incluido en parafina para la detección del virus del papiloma humano

Adalucy Álvarez-Aldana, Juan Carlos Sepúlveda-Arias
Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Tecnológica de Pereira, Pereira, Colombia

Introducción. Los métodos moleculares permiten la detección y tipificación del virus del papiloma humano (VPH) y pueden usarse en estudios retrospectivos a partir de tejidos incluidos en parafina.

Dado que la calidad del ADN obtenido de estos tejidos es de menor calidad, el objetivo de este trabajo fue comparar cinco métodos de extracción de ADN a partir de tejidos incluidos en parafina, que permitan la detección del ADN viral mediante reacción en cadena de la polimerasa y su posterior tipificación.

Materiales y métodos. Se emplearon 32 biopsias de cuello uterino incluidas en parafina (16 de lesiones preinvasivas y 16 de invasivas). Se hizo el raspado de la lesión y se procedió a la extracción de ADN con cinco métodos diferentes. Con el fin de evaluar la calidad del ADN, se amplificó el gen de la beta-globina con los cebadores PCO3/PCO4 (110 pb) y PCO3/PCO5 (209 pb). Igualmente, se amplificó una región del gen *L1* del VPH con los cebadores GP5+/GP6+ (150 pb). En las muestras positivas para el VPH, se amplificó una secuencia consenso con los cebadores pU-1M/pU-2R (228-268 pb) para los genotipos 16, 18, 31, 33, 45 y 58.

Resultados. Se obtuvo un número mayor de muestras positivas para el gen de la beta-globina humana con los cebadores PCO3/PCO4 (134/160), en comparación con PCO3/PCO5 (37/160). No se encontraron diferencias entre los cinco diferentes métodos de extracción empleados. Sólo 18 % (3/32) de las muestras fueron positivas para VPH, tanto para el gen *L1* como para la secuencia consenso.

Conclusiones. La baja detección del fragmento de 209 pb del gen de la beta-globina humana podría explicarse por la fragmentación que se presenta en el ADN debido a entrecruzamientos de las hebras en presencia de formaldehído. Esto explica la baja detección del VPH en las muestras. Sólo dos de los métodos utilizados permitieron detectar el VPH.

Detección de marcadores serológicos de infección por el virus de la hepatitis B en estudiantes universitarios de Bucaramanga, Santander

Ana Elvira Farfán, Yeny Z. Castellanos, Henry Bautista, Katherine Duarte, Andrea Quijano, Kelly Pico, Tatiana Martínez

Programa de Bacteriología y Laboratorio Clínico, Universidad de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. La infección por el virus de la hepatitis B es un problema global de salud pública; se estima que más de 400 millones de personas están crónicamente infectadas con el virus. La promiscuidad sexual y el uso de drogas ilícitas intravenosas en población joven, favorecen la transmisión del virus en este grupo.

El objetivo de este estudio fue establecer la prevalencia de marcadores serológicos de infección por el VHB en estudiantes universitarios de Bucaramanga.

Materiales y métodos. Este estudio fue realizado en cinco universidades de la ciudad de Bucaramanga, entre enero y agosto de 2010. A 1.298 estudiantes entre 18 y 35 años, quienes firmaron un consentimiento informado, se les tomaron muestras sanguíneas para obtener suero. Las mismas se procesaron mediante ELISA (Bioelisa-Biokit®, España) para la detección de marcadores serológicos: anticuerpos contra antígenos s y core (anti-HBc y anti-HBs) y antígeno s (HBsAg).

Resultados. El 47,23 % (IC_{95%}: 44,47-49,98) fueron mujeres y 52,77 % (IC_{95%}: 50,02-55,53) hombres; la edad promedio fue de 21 (DS 2,99) y 21,5 (DS 3,01) años, respectivamente. La frecuencia de los marcadores serológicos fue: anti-HBc 1,85 % (IC_{95%}: 1,08-2,6); HBsAg 1,3 % (IC_{95%}: 0,65-1,97); anti-HBs 30,8 % (IC_{95%}: 28,3-33,4). La infección activa se identificó en dos casos, 0,15 % (IC_{95%}: 0,019-0,56); 8 (0,62 %) (IC_{95%}: 0,15-1,08) fueron para infección resuelta. Se consideraron sensibles 872 (67,18 %) (IC_{95%}: 64,59-69,77) y 14 (1,08 %) (IC_{95%}: 0,48-1,68) se consideraron posibles casos de hepatitis B oculta.

Conclusiones. Se presentó una baja proporción de infección activa; sin embargo, existe el riesgo de infección en un alto porcentaje de estudiantes.

Aunque en el país se adelantan campañas de vacunación, gran parte de la población no está inmunizada, lo que sugiere fortalecer los programas de prevención para evitar nuevos casos de hepatitis B.

Financiación. UNIRED (UIS, Gobernación de Santander, Colciencias).

• • •

Hallazgos post mórtem en pacientes con infección fatal por *Pneumocystis jirovecii* y diagnóstico de VIH-sida: serie de casos de necropsias del Hospital Universitario de Santander

Julio Cesar Mantilla-Hernández, Martha Juliana Mantilla, Henry Jair Mayorga-Anaya, Óscar David Poveda-Díaz

Departamento de Patología, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Santander

Introducción. La pneumocistosis es una enfermedad pulmonar infecciosa producida por el hongo oportunista *Pneumocystis jirovecii* (antes llamado *Pneumocystis carinii*) que afecta de forma casi exclusiva a personas con un estado de inmunosupresión avanzado. Desde la aparición hace 30 años de los primeros casos de sida, la neumonía por *P. jirovecii* es una de las infecciones respiratorias más comunes en este tipo de pacientes en el mundo.

Objetivo. Describir los hallazgos histopatológicos de la pneumocistosis, así como la incidencia de la enfermedad en pacientes con diagnóstico de VIH-sida fallecidos en un hospital público de tercer nivel.

Materiales y métodos. Se llevó a cabo un estudio descriptivo y retrospectivo. Se revisaron 1.591 protocolos de necropsias practicadas en la morgue del Hospital Universitario de Santander y la Universidad Industrial De Santander entre el año 2004 y junio de 2011, de los cuales 119 casos tuvieron diagnóstico post mórtem de VIH/sida, y 20 de estos fueron casos fatales de pneumocistosis. Se determinaron medidas de proporción o porcentaje y razón para variables nominales, y medidas de tendencia central para variables numéricas.

Resultados. La edad media fue de 36,3 años para los hombres y 32,6 para las mujeres; 16 pacientes (80 %) eran hombres y 4 (20 %) eran mujeres. El diagnóstico de pneumocistosis se confirmó por la visualización directa del hongo en los tejidos examinados al microscopio óptico, previa fijación en formol al 10 %, inclusión en parafina, cortes a 5 micras y coloración con hematoxilina-

eosina, y coloraciones de PAS, Giemsa y plata metenamina. No hubo ningún caso de neumonía por *Pneumocystis* en pacientes sin diagnóstico de VIH/sida, y no se halló ningún patrón extrapulmonar de infección.

Conclusión. La infección pulmonar por *P. jirovecii* afecta aproximadamente a 17 % de los pacientes con VIH/sida en nuestro medio y continúa siendo uno de los principales gérmenes oportunistas que afectan a este grupo de pacientes.

• • •

Seroprevalencia de IgG contra el virus del dengue en niños con edades entre 1 y 15 años residentes en dos barrios que registran persistencia de transmisión del dengue en el municipio de Armenia

Laura A. Taborda¹, Jhon C. Castaño-Osorio¹, María M. González¹, Leonardo Padilla¹, Camilo Rubio², Harish Padmanabha², Liliana Quintero³

¹ Grupo Inmunología Molecular, Centro de Investigaciones Biomédicas, Universidad del Quindío, Armenia, Colombia

² Integrated Dengue Surveillance System, Integrated National Adaptation Pilot to Climate Change

³ Secretaría de Salud de Armenia, Armenia, Colombia

Introducción. El dengue es una enfermedad febril aguda transmitida por *Aedes aegypti*, que producen los serotipos 1, 2, 3 y 4 del virus dengue, de amplio espectro clínico que va desde casos inaparentes hasta formas graves. Los agentes patógenos como el del dengue inducen de manera permanente, y de acuerdo con los serotipos, inmunidad específica. El riesgo de contraer dengue se relaciona más con una infección secundaria, a la cual los niños pueden tener mayor sensibilidad.

El objetivo fue determinar la seroprevalencia de anticuerpos IgG contra dengue en niños entre 1 y 15 años, que habitan en dos barrios de Armenia.

Metodología. Se hizo un estudio descriptivo de corte transversal, utilizando una encuesta de prevalencia serológica. El muestreo se definió en cuadras en las áreas de estudio. Se recolectaron 726 muestras de sangre de niños, bajo el supuesto de 90 % de positivos. La determinación de IgG contra dengue se hizo con ELISA (Viracell®). Para el análisis estadístico se utilizó Statgraphics Centurion® para la distribución de frecuencia de las variables y se analizaron asociaciones entre estas variables utilizando Epilnfo versión 3.4.

Resultados. La seroprevalencia de IgG para el virus del dengue fue de 86,7 %. En el grupo de

niñas, 88,4 % fueron positivas y 11,8 % fueron negativas, y en el de niños, 91,5 % fueron positivos y 8,4 % fueron negativos. La proporción de la seroprevalencia para el grupo de edad fue mayor en los niños de tres años con 100 % de positivos; el rango de más positivos fue de 1 a 4 años. La seroprevalencia positiva en las áreas estudiadas fue de 86 % en el barrio 1 y de 100 % en el barrio 2.

Conclusión. El análisis serológico de anticuerpos IgG permitió corroborar la alta circulación del virus en las zonas estudiadas. El estudio no mostró diferencias entre sexo femenino y masculino respecto a la IgG positiva.

• • •

Diagnóstico de tuberculosis en pediatría por métodos moleculares

¹Luis Miguel Sosa-Ávila, Wellman Ribón², Claudia Figueroa²

¹ Grupo Paidos, Bucaramanga, Colombia

² Grupo Micobacterias, Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia

Introducción. El diagnóstico de tuberculosis en pediatría constituye un reto diagnóstico debido a: la heterogeneidad de la presentación clínica, la baja sensibilidad de los métodos tradicionales y a que los niños son paucibacilares.

Materiales y métodos. Se presentan cinco casos de tuberculosis con diagnóstico hecho por métodos moleculares.

Resultados. *Caso 1.* Se trata de un niño de 4 años, de Río de Oro, Cesar, con ascitis sin hipertensión portal, hidrocele, linfedema de miembros inferiores de tres meses, adenomegalias generalizadas, desnutrición, anemia y trombocitopenia. La tinción de Ziehl-Neelsen (ZN) fue negativa en líquido ascítico y se detectaron ácidos nucleicos de *Mycobacterium tuberculosis*.

Caso 2. Se trata de una niña de 7 años de edad, de Tame, Arauca, con diagnóstico de tuberculosis en marzo de 2011; inició tratamiento antituberculoso y lo suspendió. Actualmente se encuentra con insuficiencia respiratoria crónica, y la tomografía axial de tórax muestra cavernas, bronquiectasias, consolidaciones y fibrosis. En secreciones respiratorias (ZN, 1/3), se detectaron 9 bacilos/100 campos y ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*.

Caso 3. Se trata de una paciente de 14 años, de Bucaramanga, con cefalea global, fiebre, deterioro cognitivo y convulsión tónico-clónico generalizada. El líquido cefalorraquídeo mostró pleocitosis linfocítica, hipoglucorraquia y Ziehl-Neelsen negativo. Se inició tratamiento antituberculoso. Por falta de mejoría, se tomó una nueva muestra

de líquido cefalorraquídeo y se detectaron ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*.

Caso 4. Es un niño de 5 años, de Bucaramanga, con adenopatía no dolorosa de 4 cm en el cuello y sin manifestaciones respiratorias. La biopsia de ganglio linfático mostró inflamación granulomatosa, necrosis de coagulación y Ziehl-Neelsen negativo. En muestra de esputo (ZN, 2/3) se detectaron 5 bacilos/100 campos y ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*.

Caso 5. Se trata de un niño de 22 meses, con antecedentes de neumonías recurrentes (2/5 episodios con hemocultivos positivos para *S. pneumoniae*) y adenopatía axilar izquierda. La biopsia de ganglio mostró inflamación granulomatosa crónica y Ziehl-Neelsen positivo. En una muestra de tejido posterior, hubo Ziehl-Neelsen ++ y detección de ácidos nucleicos de *M. tuberculosis*.

Conclusiones. Los métodos de amplificación de ácidos nucleicos permiten un rápido diagnóstico y son útiles en pacientes paucibacilares.

• • •

Estudio seroepidemiológico mediante la técnica de inmunocromatografía MABA (Multiple Antigen Blot Assay) en una población de un área rural de Venezuela

Marilyn Toledo^{1,2}, Sandra Losada¹, Belkisyolé Alarcón^{1,2}, Rosa Contreras^{1,2}, Olinda Delgado^{1,2}, Rosalba Moros³, Marta Cardona³, Nahir Rodríguez¹, Vera Reviakina³, Mercedes Panizo³, Maribel Dolande³, Elsa Chacón³, Héctor Pérez³, Óscar Noya^{1,2}

¹ Instituto de Medicina Tropical "Dr. Félix Pifano", Facultad de Medicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

² Cátedra de Parasitología, Escuela de Medicina "Luis Razetti", Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela

³ Instituto Nacional de Higiene "Rafael Rangel", Ministerio del Poder Popular para la Salud, Caracas, Venezuela

Introducción. En países en vías de desarrollo, los pobladores están expuestos a frecuentes, múltiples y simultáneos agentes infecciosos, por lo cual es necesario disponer de métodos diagnósticos de bajo costo que permitan determinar en un solo ensayo el perfil de riesgo del individuo y de la población. La técnica de inmunocromatografía para el multidiagnóstico simultáneo (MABA) puede utilizarse para la evaluación serológica inicial de un individuo o de una población, tanto para el clínico como para el epidemiólogo, ya que permitiría tomar tempranamente conductas terapéuticas o de

control de algunas endemias en una región.

En el presente trabajo se plantea evaluar la sensibilidad, especificidad y valor diagnóstico del MABA con diferentes agentes infecciosos en muestreos de campo.

Materiales y métodos. Se evaluaron 224 sueros de escolares previo consentimiento informado de sus representantes, en la localidad rural de Belén, Estado Carabobo, Venezuela. Las muestras fueron examinadas por MABA para las siguientes enfermedades: enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, amibiasis, leishmaniasis, toxocariasis, esquistosomiasis mansoni, fascioliasis, cisticercosis, hidatidosis, leptospirosis, histoplasmosis, VIH y hepatitis C. Para el análisis comparativo, cada suero se evaluó en paralelo con pruebas de referencia.

Resultados. Los antígenos evaluados revelaron las siguientes prevalencias: *Toxoplasma gondii* (25,89 %), *Entamoeba histolytica* (3,57 %), *Trypanosoma cruzi* (0,45 %), leptospirosis (4 %), histoplasmosis (30 %), *S. mansoni* (1,78 %) y toxocariasis (72,32 %). No hubo reconocimiento en los pacientes evaluados para las siguientes enfermedades: leishmaniasis, fascioliasis, cisticercosis, hidatidosis, VIH y hepatitis C. Para enfermedad de Chagas, toxoplasmosis, esquistosomiasis y amibiasis, hubo una concordancia de 100 % cuando se confirmaron con las pruebas de diagnóstico convencional. La sensibilidad y especificidad de la técnica variaron entre 75 y 100 %.

Conclusiones. La posibilidad de evaluar simultáneamente 13 agentes causales con una muestra pequeña de suero (6 µl), con gran sensibilidad y especificidad, revela el enorme potencial del MABA en los programas de vigilancia epidemiológica.

• • •

Ensaio imunoenzimático (ELISA): comparação da proteína recombinante NCSRS2 produzida em *Escherichia coli* e *Pichia pastoris*

Relber Aguiar Gonçalves, Talita Bandeira Roos, Ana
Muñoz Vianna, Lucas Bigolin Lorenzon, Juliano Lacava
Pereira, Maria Elizabeth Aires Berne, Fábio Pereira
Leivas Leite
Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil

Introdução. A neosporose é considerada uma parasitose emergente no mundo, estando entre as principais causas de abortos em bovinos e é responsável por alto percentual de mortalidade neonatal nestes animais. A infecção de bovinos por *Neospora caninum* tem sido alvo de estudos em rebanhos em todo o mundo devido à importância das perdas econômicas associadas aos transtornos reprodutivos e diminuição na produção de leite.

Objetivo. Comparar a proteína recombinante NcSRS2 produzida em *Escherichia coli* cepa BL21 DE3 Codon Plus Star e em *Pichia pastoris* cepa X33 e avaliar a sua utilização como imunológico em testes diagnósticos para neosporose.

Metodologia. O gene que codifica para a proteína NcSRS2 foi clonado em vetores de expressão para levedura (pPICZαB) e para bactérias (pET201D-TOPO). Após a clonagem, as cepas foram cultivadas e em seguida, induzidas com metanol 0,5% para *P. pastoris* cepa X33 e IPTG 0,5M para cepa de *E. coli*. Por conseguinte, as proteínas foram dialisadas, purificadas, liofilizadas e quantificadas pelo Método de Bradford. Como produto final obteve-se uma concentração média de 700 ng/µl para *P. pastoris* e 80 ng/µl para *E. coli*. Com a proteína purificada realizou-se o ensaio imunoenzimático (ELISA) utilizando-se a concentração de 100 ng.

Resultados. Observou-se que a proteína rNcSRS2 expressa em *E. coli* apresentou títulos de anticorpos 1,2 vezes maior comparando os soros positivos aos negativos, enquanto que os títulos em *P. pastoris* foi 2,15 vezes maior.

Conclusão. A proteína rNcSRS2 expressa em *P. pastoris* foi mais sensível no teste de ELISA quando comparada à rNcSRS2 expressa em *E. coli*, sugerindo assim que a expressão no sistema heterólogo é uma opção a ser considerada para produção de proteínas recombinantes para serem posteriormente utilizadas como insumos imunológicos e moleculares para diagnóstico.

• • •